



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 62-259597 = CA  
108: 155121p  
(43) Date of publication of application : 11.11.1987

(51) Int.Cl. C12P 21/02

(21) Application number : 61-104319 (71) Applicant : AJINOMOTO CO INC  
(22) Date of filing : 07.05.1986 (72) Inventor : HONDA YUTAKA  
TSUCHIYA TOYORITO  
TAKEMOTO TADASHI  
YUGAWA TOSHIHIDE

(54) ENZYMIC SYNTHESIS OF N-PROTECTED PEPTIDE

(57) Abstract:

PURPOSE: To efficiently obtain the titled compound, by reacting an N-protected amino acid with an amino acid in an aqueous layer in a two-phase system reaction medium of an organic solvent containing a quaternary ammonium salt, etc., and water using a proteolytic enzyme and migrating the resultant product to an organic solvent phase.

CONSTITUTION: An N-protected amino acid, e.g. N-acetyl-L-aspartic acid, etc., or a derivative thereof is reacted with an amino acid, e.g., L-phenylalanine, etc., or a derivative thereof in an aqueous layer in a two-phase system reaction medium of a water-immiscible organic solvent containing a dissolved quaternary ammonium salt, e.g. triethylmethylammonium chloride, etc., or quaternary phosphonium salt and water using a proteolytic enzyme to form an N-protected peptide containing one or more carboxyl groups. The resultant N-protected peptide is then converted into a lipophilic quaternary ammonium salt or phosphonium salt and migrated to the organic solvent phase to afford the aimed compound.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]  
[Date of sending the examiner's decision of rejection]  
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

④Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④公開 昭和62年(1987)11月11日

C 12 P 21/02

6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

④発明の名称 N-保護ペプチドの酵素的合成法

④特 願 昭61-104319

④出 願 昭61(1986)5月7日

④発 明 者	本 多 裕	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
④発 明 者	土 屋 豊 人	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
④発 明 者	竹 本 正	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
④発 明 者	湯 川 利 秀	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
④出 願 人	味の素株式会社	東京都中央区京橋1丁目5番8号	

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

N-保護ペプチドの酵素的合成法

## 2. 特許請求の範囲

(1) N-保護アミノ酸またはその誘導体とアミノ酸またはその誘導体とを、4級アンモニウム塩または4級ホスホニウム塩を溶解した水溶液と性有機酸と水との2相系反応媒体中において水層で蛋白分解酵素を用いて反応させ、生成した少くとも1つのカルボキシル基をもつN-保護ペプチドを親油性の4級アンモニウム塩または4級ホスホニウム塩として有機酸媒体に移行させることを特徴とするN-保護ペプチドまたはその誘導体の酵素的合成法。

(2) N-保護アミノ酸またはその誘導体とアミノ酸またはその誘導体とを水中で蛋白分解酵素を用いて反応させ、生成した少くとも1つのカルボキシル基をもつN-保護ペプチドを4級アンモニウム塩または4級ホスホニウム塩を溶解した水溶液と性有機酸とで抽出回収することを特徴とする

N-保護ペプチドまたはその誘導体の酵素的合成法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、N-保護ペプチドの酵素的合成法に関し、更に詳しくは少なくとも1つのカルボキシル基をもつN-保護ペプチドの酵素的合成法に関する。

近年、ペプチド合成において、酵素を用いる方法がセラミ化を招きにくいという理由から注目を集め、種々のペプチド合成への利用が試みられている。ところで、この方法では酵素として蛋白分解酵素を用いる為、通常、一旦生成したペプチドの加水分解反応を伴う。因みに、この蛋白分解酵素を用いる反応は、開鎖の如く、平衡反応である。

従って、ペプチド結合生成反応を効率よく進めるためには加水分解反応を抑制するのが重要なポイントであり、現状では、生成物を沈澱させて反応系外に除き加水分解反応を妨げる方法や、水と混和しない有機酸を水に添加した2相系反応媒体中で反応を行ない、生成物を有機酸層側に抽出

して反応系外に除く方法が主として用いられている。しかし、これらの方法では、生成物にカルボキシル基を持つものなどでは、通常の酵素反応の条件の下では水に対する溶解度が高い為、沈殿もせず、有機層界面にも抽出されず、反応は効率よく進行しない。特に、蒸発のアミノ基の保護基として親水性の高いホルミル基(以下、Forと略記する。)やアセチル基(以下Acと略記する。)を用いた場合は特に顕著である。ところで蛋白分解酵素にはエンド型とエキソ型があるが、エキソ型の酵素であるカルバキシルペプチダーゼを用いた場合には、アミノ基側の基質としてアミノ酸を使用するので、生成物のペプチドのカルボキシル末端は遊離のカルボキシル基となり、正に上記の例にあてはまる。

そこで本発明者らは、N-保護したアミノ酸あるいはその誘導体とアミノ酸あるいはその誘導体を蛋白分解酵素を用いて反応させ、少なくとも1つのカルボキシル基を有するN-保護ペプチドを効率よく合成する方法につき調査検討した結果、

### (3)

方法ではN-保護- $\beta$ -L-アスパルテル-L-フェニルアラニンが副生することや、腐食性の高い酢酸を使用することなど、優れた方法とは言いがたい。本発明方法を適用すれば、上記欠点を克服し、N-保護- $\alpha$ -APのみを効率よく合成することができる。

実施例に示すように、本発明方法を用いると、水中における酵素反応に比し、生成するN-保護ペプチドの収率が大幅に向上する。例えば、保護基がアセチル基の場合、水溶液中の反応では、N-アセチル- $\alpha$ -L-アスパルテル-L-フェニルアラニン(以下、Ac- $\alpha$ -APと略記する。)の収率は5.2% (比較例2)であるが、本発明方法をもちいるとAc- $\alpha$ -APの収率は2.0% (実施例7)に向上する。又、保護基がベンジルオキシカルボニル基の場合も、水溶液中の反応ではN-ベンジルオキシカルボニル- $\alpha$ -L-アスパルテル-L-フェニルアラニンの収率は2.4% (比較例5)であるが、本発明方法を用いると8% (実施例15)に向上した。

### (5)

驚くべきことに、本酵素反応を有機溶媒と水の2相系反応媒体中で4級アンモニウム塩あるいは4級ホスホニウム塩の存在下に行なうことにより、本来有機層界面には移行しない生成物を親油性の4級アンモニウム塩あるいは4級ホスホニウム塩として、有機層界面に移行させ、ペプチド生成反応を効率よく進行させる事を見出し、本発明を完成させるに至った。

本発明方法は、近年、優れた甘味剤として注目されているアスパルテーム( $\alpha$ -L-アスパルテル-L-フェニルアラニンメタルエステル)の重要な製造中間体であるN-保護- $\alpha$ -L-アスパルテル-L-フェニルアラニン(以下、N-保護- $\alpha$ -APと略記する。)の合成に適用すれば特に効力を発揮する。即ち、N-保護- $\alpha$ -APは容易にアスパルテームに変換される(特公昭60-50,200)が、N-保護- $\alpha$ -APの製造法としては唯一、N-保護-L-アスパラギン酸脱水物とL-フェニルアラニンを酢酸中で反応させる方法がとられている(特公昭53-25,133)が、この

### (4)

本発明方法によると、例1に2相系反応媒体を用いてN-保護ペプチド合成反応を行ない、生成したN-保護ペプチドを親油性の4級アンモニウム塩あるいは4級ホスホニウム塩として有機層界面に移行させることによりペプチド生成反応を効率よく進行させるが、また、第2にN-保護アミノ酸あるいはその誘導体とアミノ酸あるいはその誘導体を水中で蛋白分解酵素を用いて反応させた後、有機溶媒と4級アンモニウム塩あるいは4級ホスホニウム塩を添加し、生成したN-保護ペプチドと原料のN-保護アミノ酸あるいはその誘導体とアミノ酸あるいはその誘導体の有機層界面/水の分配係数の差を利用して生成したN-保護ペプチドを有機層界面に抽出することも出来る。

有機層界面と水層とを分離した後、第1の方法により、水層に再渡、4級アンモニウム塩あるいは4級ホスホニウム塩を含む有機層界面を加えて2相系反応媒体中でペプチド生成反応を行ない、これを繰り返して行えば、ペプチド生成反応を効率よく進行させることが出来るのはいうまでもない。

### (6)

もちろん、第2の方法によつてペプチド生成反応を繰返し行なつてもよい。

本発明方法において用いられるN-保護アミノ酸およびその誘導体のN-保護基としては、通常のペプチド合成において使用される保護基、例えば、ホルミル基、アセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、t-ブチルオキシカルボニル基、フェノキシアセチル基、1-メチル-2-アセチルビニル基及びアセトアセチル基が用いられる他、アミノ酸残基も用いられるが、中でもホルミル基、アセチル基、ベンジルオキシカルボニル基が好適に用いられる。アミノ酸残基がN-保護基となっているN-保護アミノ酸としては、例えば、N-ホルミル-L-アラニン、L-アスパラギン酸がある。また、N-保護アミノ酸誘導体としては、例えば、N-ホルミル-L-アスパラギン酸-N-α-メチルエステルがある。

N-保護アミノ酸またはその誘導体と反応させるアミノ酸またはその誘導体のうち、最後のアミノ酸誘導体としては、例えば、L-フェニルア

(7)

ラジ、プロノール、アミルアルコールのごときアルコール類、メチルエチルケトンのごときケトン類、ジエチルエーテル、ジソプロピルエーテルのごときエーテル類などが代表的なものであり、これらのうちの任意の2種類以上からなる混合溶媒を使用することも出来る。

本発明の方法においても用いられる酵素としては、蛋白質分解酵素であれば特に制限はない。又、酵素反応を行なう際の反応容のpHは使用する酵素の種類により異なり、例えば、プロテアーゼM〔大野製薬社製〕及びオリエンターゼ5A〔オリエンタル酵母社製〕の場合は3~7で、サホーゼ（大和化成社製）の場合は6~8である。本発明の酵素反応は温度20~90℃、酵素活性を維持する観点からは20~50℃で行なうとよい。

本発明の方法において、抽出発物質の使用濃度には特に制限はないが、ペプチド生成反応をより効率よく進行させるためには、高い方が望ましい。ペプチド生成反応を進行させるという観点からは、抽出物質の濃度が重要であつて、両者の使用比率

(8)

ラニメチルエステルがある。

なお、N-保護アミノ酸またはその誘導体とそれに反応させるアミノ酸またはその誘導体との組合せは、生成するN-保護ペプチドまたはその誘導体が少なくとも1つの遊離のカルボキシル基をもつものでなければならぬ。これは、前述のように、生成したN-保護ペプチドまたはその誘導体を有機溶媒に溶解している4級アンモニウム塩または4級ホスホニウム塩のカチオン部分と結合させて新たにN-保護ペプチドまたはその誘導体の親水性の4級アンモニウム塩または4級ホスホニウム塩とするためである。

又、有機溶媒としては、4級アンモニウム塩または4級ホスホニウム塩を溶解し得てかつ水と均一に混和しないもので抽出物質及び目的生成物に特に活性なものでなければ、いかなる溶媒も使用することが出来る。トルエン、キシレン、ヘキサンのごとく炭化水素類、酢酸エチル、酢酸ブタンのごとくエステル類、クロロホルム、硝化炭素、エタレンジクロライドのごときハロゲン化炭化水

(9)

素には特に制限はない。

本発明方法において用いられる4級アンモニウム塩あるいはホスホニウム塩としては特に制限はない、トリオクタメチルアンモニウムクロリド（ヘンケル社製 Allquat 333 など）、セチルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、タラロブサルホスホニウムプロマイドなどが好適に用いられる。又、その塩は抽出発物質に対して多ければ多いが、目的生成物を有機溶媒層に移行させる場合、あまり多すぎると酵素活性を低下させる場合があるので、抽出発物質の濃量に対して0.3~5.0重量倍の比率でもよい。

有機溶媒層に第4級アンモニウム塩またはホスホニウム塩の形で移行したN-保護ペプチドまたはその誘導体を分離回収するには、例えば、次のようにするとよい。4級アンモニウム塩またはホスホニウム塩の形になったN-保護ペプチドまたはその誘導体は例えば食塩水等と混合することにより遊離させることができる。すなわち、分離した有機溶媒層から食塩水で抽出すればよい。食塩

(10)

水の濃度は2~20(重量)がよい。

以下、実施例、比較例により、本発明をさらに説明する。

#### 実施例1

N-アセチル-L-アスパラギン酸(以下、Ac-Aspと略記する。)0.54g(3.1mmol)とL-フェニルアラニン(以下、Pheと略記する。)0.1g(0.6mmol)を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM(天野製薬社製)50mgを添加した。完全に溶解させた後、トリオクタメチルアンモニウムクロリド(Aliquat 336)1.25g(3.1mmol)のトルエン溶液10mlを加え、40℃で24時間振盪した。

反応液中(水層及びトルエン層)のAc-α-APを高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLCと略記する。)にて定量化したところ、Pheに対して4.2%の収率で生成していた(水層1.2%,トルエン層3.0%)。

(11)

g(3.1mmol)のクロロホルム溶液10mlを加え、40℃で24時間振盪した。

反応液中(水層及びクロロホルム層)のAc-α-APを、HPLCにて定量化したところ、Pheに対して4.2%の収率で生成していた(水層1.2%,クロロホルム層3.0%)。

#### 実施例4

Ac-Asp 0.54g(3.1mmol)とPhe 0.1g(0.6mmol)を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM(天野製薬社製)50mgを添加した。完全に溶解させた後、テトラ-ブチルアンモニウムブロマイド1.05g(3.1mmol)の1,2-ジクロロエタン溶液10mlを加え、40℃で24時間振盪した。

反応液中(水層及び1,2-ジクロロエタン層)のAc-α-APを、HPLCにて定量化したところ、Pheに対して3.1%の収率で生成していた(水層1.6%,1,2-ジクロロエタン層1.5%)。

比較例1(実施例1~5に対する比較例)

(13)

#### 実施例2

Ac-Asp 0.54g(3.1mmol)とPhe 0.1g(0.6mmol)を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM(天野製薬社製)50mgを添加した。完全に溶解させた後、トリオクタメチルアンモニウムクロリド(Aliquat 336)1.25g(3.1mmol)の四塩化炭素溶液10mlを加え、40℃で24時間振盪した。

反応液中(水層及び四塩化炭素層)のAc-α-APを、HPLCにて定量化したところ、Pheに対して4.3%の収率で生成していた(水層1.1%,四塩化炭素層3.2%)。

#### 実施例3

Ac-Asp 0.54g(3.1mmol)とPhe 0.1g(0.6mmol)を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM(天野製薬社製)50mgを添加した。完全に溶解させた後、セチルジメチルベンジルアンモニウムクロリド1.23

(12)

Ac-Asp 0.54g(3.1mmol)とPhe 0.1g(0.6mmol)を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM(天野製薬社製)50mgを添加した。完全に溶解させた後、40℃で24時間振盪した。

水溶液中のAc-α-APをHPLCにて定量化したところ、Pheに対して1.6%の収率で生成していた。

#### 実施例5

Ac-Asp 2.17g(12.4mmol)とPhe 0.1g(0.6mmol)を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM(天野製薬社製)50mgを添加した。完全に溶解させた後、トリオクタメチルアンモニウムクロリド(Aliquat 336)1.25g(3.1mmol)のトルエン溶液10mlを加え、40℃で24時間振盪した。

反応液中(水層及びトルエン層)のAc-α-APを、HPLCにて定量化したところ、Pheに対して1.1%の収率で生成していた(水層3.3%,トルエン

(14)

図7(8)。

#### 実施例6

Ac-Asp 2.17 g (12.4 mmol) と Ph<sub>0</sub> 0.1 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 5.0 ㎎ を添加した。完全に溶解させた後、トリオクタメサルアンモニウムクロリド (Aliquat 336) 1.25 g (3.1 mmol) のトルエン/ヘキサン (1/1) 溶液 1.0 ml を加え、40℃で4時間振盪した。

反応液中 (水層及びトルエン/ヘキサン層) の Ac-α-AP を、HPLC にて定量したところ、Ph<sub>0</sub> に対して 1.0 % の収率で生成していた (水層 3.1 %, トルエン/ヘキサン層 7.9 %)。

#### 実施例7

Ac-Asp 2.17 g (12.4 mmol) と Ph<sub>0</sub> 0.1 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) (16)

を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 2.00 ㎎ を添加した。完全に溶解させた後、トリオクタメサルアンモニウムクロリド (Aliquat 336) 1.25 g (3.1 mmol) のトルエン溶液 1.0 ml を加え、40℃で4時間振盪した。

反応液中 (水層及びトルエン層) の Ac-α-AP を、HPLC にて定量したところ、Ph<sub>0</sub> に対して 5.0 % の収率で生成していた (水層 1.5 %, トルエン層 3.5 %)。

#### 実施例9

Ac-Asp 0.54 g (3.1 mmol) と Ph<sub>0</sub> 0.1 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 3.0 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 5.0 ㎎ を添加した。完全に溶解させた後、トリオクタメサルアンモニウムクロリド (Aliquat 336) 1.25 g (3.1 mmol) のトルエン溶液 1.0 ml を加え、40℃で2時間振盪した。

反応液中 (水層及びトルエン層) の Ac-α-AP

(17)

を、HPLC にて定量したところ、Ph<sub>0</sub> に対して 3.4 % の収率で生成していた (水層 0.9 %, トルエン層 2.5 %)。

反応液中 (水層及びトルエン層) の Ac-α-AP を、HPLC にて定量したところ、Ph<sub>0</sub> に対して 2.0 % の収率で生成していた (水層 5.1 %, トルエン層 1.5 %)。

比較例2 (実施例5～7に対する比較例)

Ac-Asp 2.17 g (12.4 mmol) と Ph<sub>0</sub> 0.1 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 5.0 ㎎ を添加した。完全に溶解させた後、40℃で4時間振盪した。

水液中の Ac-α-AP を HPLC にて定量したところ、Ph<sub>0</sub> に対して 5.2 % の収率で生成していた。

#### 実施例8

Ac-Asp 0.54 g (3.1 mmol) と Ph<sub>0</sub> 0.1 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を (16)

を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 2.00 ㎎ を添加した。完全に溶解させた後、トリオクタメサルアンモニウムクロリド (Aliquat 336) 1.25 g (3.1 mmol) のトルエン溶液 1.0 ml を加え、25℃で9.6時間振盪した。

#### 実施例10

Ac-Asp 0.54 g (3.1 mmol) と Ph<sub>0</sub> 0.1 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 5.0 ㎎ を添加した。完全に溶解させた後、トリオクタメサルアンモニウムクロリド (Aliquat 336) 1.25 g (3.1 mmol) のトルエン溶液 1.0 ml を加え、25℃で9.6時間振盪した。

反応液中 (水層及びトルエン層) の Ac-α-AP を、HPLC にて定量したところ、Ph<sub>0</sub> に対して 4.0 % の収率で生成していた (水層 1.2 %, トルエン層 2.8 %)。

#### 実施例11

N-ホルミル-L-レバヌラシン酸 (以下、For-Asp と略記する。) 0.5 g (3.1 mmol) と Ph<sub>0</sub> 0.1 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水

(18)

酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM（天野製薬社製）50mgを添加した。完全に溶解させた後、トリオクタルメチルアンモニウムクロリド（Aliquat 336）1.25g（3.1mmol）のトルエン溶液10mlを加え、40℃で72時間振盪した。

反応液中（水層及びトルエン層）のN-ホルミル-L-アスパラギン-L-フェニルアラニン（以下、For-α-APと略記する。）をHPLCにて定量したところ、pheに対して2.9%の収率で生成していた（水層0.7%, トルエン層2.2%）。

比較例3（実施例11に対する比較例）

For-Asp 0.5g（3.1mmol）とphe 0.1g（0.6mmol）を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM（天野製薬社製）50mgを添加した。完全に溶解させた後、40℃で72時間振盪した。

水液中のFor-α-APをHPLCにて定量したところ、

(19)

ンタル酵母社製）50mgを添加した。完全に溶解させた後、トリオクタルメチルアンモニウムクロリド（Aliquat 336）1.25g（3.1mmol）の酢酸エチル溶液10mlを加え、40℃で71時間振盪した。

反応液中（水層及び酢酸エチル層）のFor-α-APをHPLCにて定量したところ、pheに対して1.1%の収率で生成していた（水層0.3%, 酢酸エチル層0.8%）。

比較例4（実施例13に対する比較例）

For-Asp 0.5g（3.1mmol）とphe 0.1g（0.6mmol）を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にオリエンターゼ5A（オリエンタル酵母社製）50mgを添加した。完全に溶解させた後、40℃で71時間振盪した。

水液中のFor-α-APをHPLCにて定量したところ、pheに対して0.4%の収率で生成していた。

実施例14

N-ホルミル-L-アスパラギン酸-α-メチ

(21)

pheに対して0.6%の収率で生成していた。

実施例12

For-Asp 2.0g（12.4mmol）とphe 0.1g（0.6mmol）を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM（天野製薬社製）50mgを添加した。完全に溶解させた後、トリオクタルメチルアンモニウムクロリド（Aliquat 336）1.25g（3.1mmol）のトルエン溶液10mlを加え、40℃で76時間振盪した。

反応液中（水層及びトルエン層）のFor-α-APをHPLCにて定量したところ、pheに対して6.3%の収率で生成していた（水層2.0%, トルエン層4.3%）。

実施例13

For-Asp 0.5g（3.1mmol）とphe 0.1g（0.6mmol）を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にオリエンターゼ5A（オリエン

(20)

ルエンタル（以下、For-Asp-OMeと略記する。）0.54g（3.1mmol）とphe 0.1g（0.6mmol）を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM（天野製薬社製）50mgを添加した。完全に溶解させた後、トリオクタルメチルアンモニウムクロリド（Aliquat 336）1.25g（3.1mmol）のトルエン溶液10mlを加え、40℃で65時間振盪した。

反応液中（水層及びトルエン層）のFor-α-APをHPLCにて定量したところ、pheに対して7.2%の収率で生成していた（水層1.9%, トルエン層5.3%）。

比較例5（実施例14に対する比較例）

For-Asp-OMe 0.54g（3.1mmol）とphe 0.1g（0.6mmol）を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 4.5に調整した後、全体を5mlにした。この水溶液にプロテアーゼM（天野製薬社製）50mgを添加した。完全に溶解させた後、40℃で65時間振盪した。

(22)

水液中の  $\text{Phe}-\alpha\text{-AP}$  を HPLC にて定量したところ、 $\text{Phe}$  に対して 2.1 % の収率で生成していた。

#### 実施例 15

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸(以下、 $\text{Z-Asp}$  と略記する。) 0.83 g (3.1 mmol) と  $\text{Phe}$  0.1 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 50 単位を加えた。完全に溶解させた後、トリオクタメチルアンモニウムクロリド (Ailquest 336) 1.25 g (3.1 mmol) のトルエン溶液 10 ml を加え、40℃ で 4 時間振盪した。

反応液中(水層及びトルエン層)の N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸-L-フェニルアラニン(以下、 $\text{Z-}\alpha\text{-AP}$  と略記する。)を HPLC にて定量したところ、 $\text{Phe}$  に対して 8.1 % の収率で生成していた(水層 1.4 %, トルエン層 7.0 %)。

比較例 6 (実施例 15 に対する比較例)

#### (23)

ルオキシカルボニル-L-フェニルアラニンメチルエステル(以下、 $\text{Z-}\alpha\text{-APM}$  と略記する。))を HPLC にて定量したところ、 $\text{Phe}$  に対して 5.4 % の収率で生成していた(水層 1.8 %, トルエン層 3.6 %)。

比較例 7 (実施例 16 に対する比較例)

$\text{Z-Asp}$  0.67 g (2.5 mmol) と  $\text{Phe}$  0.45 g (2.5 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 6.2 に調整した後、全体を 18 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 120 単位を加えた。完全に溶解させた後、40℃ で 3 時間振盪した。

水液中の  $\text{Z-}\alpha\text{-APM}$  を HPLC にて定量したところ、 $\text{Phe}$  に対して 19.4 % の収率で生成していた。

#### 実施例 17

N-アセチル-L-アラニン(以下、 $\text{Ac-Ala}$  と略記する。) 0.4 g (3.6 mmol) と  $\text{L-}\alpha\text{-Ile}$  (以下、 $\text{Leu}$  と略記する。) 0.8 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液

#### (25)

$\text{Z-Asp}$  0.83 g (3.1 mmol) と  $\text{Phe}$  0.1 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 50 単位を加えた。完全に溶解させた後、40℃ で 4 時間振盪した。

水液中の  $\text{Z-}\alpha\text{-AP}$  を HPLC にて定量したところ、 $\text{Phe}$  に対して 2.4 % の収率で生成していた。

#### 実施例 16

$\text{Z-Asp}$  0.67 g (2.5 mmol) と  $\text{L-フェニルアラニンメチルエステル}$ (以下、 $\text{FM}$  と略記する。) 0.45 g (2.5 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 6.2 に調整した後、全体を 18 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 120 単位を加えた。完全に溶解させた後、トリオクタメチルアンモニウムクロリド (Ailquest 336) 2.06 g (5.1 mmol) のトルエン溶液 20 ml を加え、40℃ で 3 時間振盪した。

反応液中(水層及びトルエン層)の N-ベンジ

#### (24)

を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5.0 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 50 単位を加えた。完全に溶解させた後、トリオクタメチルアンモニウムクロリド (Ailquest 336) 1.22 g (3.0 mmol) のトルエン溶液 10 ml を加え、40℃ で 4 時間振盪した。

反応液中(水層及びトルエン層)の  $\text{Ac-Ala-Leu}$  を HPLC にて定量したところ、 $\text{Leu}$  に対して 2.3 % の収率で生成していた(水層 0.6 %, トルエン層 1.7 %)。

比較例 8 (実施例 17 に対する比較例)

$\text{Ac-Ala}$  0.4 g (3.6 mmol) と  $\text{Leu}$  0.8 g (0.6 mmol) を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 4.5 に調整した後、全体を 5 ml にした。この水溶液にプロテアーゼ M (天野製薬社製) 50 単位を加えた。完全に溶解させた後、40℃ で 4 時間振盪した。

水液中の  $\text{Ac-Ala-Leu}$  を HPLC にて定量したところ、 $\text{Leu}$  に対して 1.7 % の収率で生成していた。

#### 実施例 18

#### (26)



比較例 3 と同様反応させて得られた *For-Asp* 2.5 g, *For- $\alpha$ -AP* 0.09 g 及び *L-Phs* 0.5 g を含む酢酸反応液 2.5 ml にトリオクサルメチルアンモニウムクロリド 6.25 g のトルエン溶液 5.0 ml を加え、pH を 4.4 に調整した後、37℃で15分間振盪した。

トルエン層を分離し、*For-Asp*、*For- $\alpha$ -AP* 及び *L-Phs* を HPLC にて定量化したところ、トルエン層中に *For- $\alpha$ -AP* は 7.6% 抽出されていた。一方、*For-Asp*, *Phs* は、それぞれ、9%, 7% 抽出されたにすぎなかった。因みに、*For- $\alpha$ -AP*, *For-Asp* 及び *Phs* の水-トルエン間の分配係数は、それぞれ、1.35, 0.04, 0.03 であった。

比較例 9 (実施例 18 に対する比較例)

トリオクサルメチルアンモニウムクロリドを添加しない以外は、実施例 18 と同様の実験を行ったところ、*For- $\alpha$ -AP* はトルエン層中に全く抽出されず、その分配係数は 0 であった。

実施例 19

比較例 1 と同様反応して得られた *Ac-Asp* 2.6g,

(27)

*Ac- $\alpha$ -AP* 0.015 g 及び *Phs* 0.5 g を含む酢酸反応液 2.5 ml にトリオクサルメチルアンモニウムクロリド 6.25 g のトルエン溶液 5.0 ml を加え、pH を 4.4 に調整した後、37℃で15分間振盪した。

トルエン層を分離し、*Ac-Asp*、*Ac- $\alpha$ -AP* 及び *L-Phs* を HPLC にて定量化したところ、トルエン層中に *Ac- $\alpha$ -AP* は 6.3% 抽出されていた。一方、*Ac-Asp*、*Phs* は、それぞれ、9%, 2% 抽出されたにすぎなかった。因みに、*Ac- $\alpha$ -AP*, *Ac-Asp* 及び *L-Phs* の水-トルエン間の分配係数は、それぞれ、1.03, 0.07, 0.01 であった。

比較例 10 (実施例 19 に対する比較例)

トリオクサルメチルアンモニウムクロリドを添加しない以外は、実施例 19 と同様の実験を行ったところ、*Ac- $\alpha$ -AP* はトルエン層中に全く抽出されず、その分配係数は 0 であった。

特許出願人 味の素株式会社

(28)